

Schlussbericht gemäß Nr. 3.2 BNBest-BMBF 98

Zuwendungsempfänger: <u>01.10.2006 - 30.11.2008:</u> Rudolf-Virchow-Zentrum DFG-Forschungszentrum für Experimentelle Biomedizin Proteinmassenspektrometrie, AG Sickmann Universität Würzburg Versbacher Str. 9 D - 97078 Würzburg <u>01.12.2008 - 31.12.2009:</u> Leibniz - Institut für Analytische Wissenschaften - ISAS - e.V. FB 2 Bioanalytik Bunsen-Kirchhoff-Str. 11 44139 Dortmund Germany	
Ausführende Stelle: <u>01.10.2006 - 30.11.2008:</u> Rudolf-Virchow-Zentrum DFG-Forschungszentrum für Experimentelle Biomedizin Proteinmassenspektrometrie, AG Sickmann Universität Würzburg Versbacher Str. 9 D - 97078 Würzburg <u>01.12.2008 - 31.12.2009:</u> Leibniz - Institut für Analytische Wissenschaften - ISAS - e.V. FB 2 Bioanalytik Bunsen-Kirchhoff-Str. 11 44139 Dortmund Germany	Förderkennzeichen: 0313865C
Vorhabenbezeichnung: Quantitative Analyse zur Beschreibung dynamischer Prozesse in lebenden Systemen. Teilprojekt C: Dynamik der phospho-spezifischen Interaktionen der Ena/ VASP-Proteine in den cAMP/ cGMP-abhängigen Signalwegen	
Laufzeit des Vorhabens: 01.10.2006 – 31.12.2009	

Weitere Anlagen:

- Zwischenbericht gemäß Nr. 3.1 BNBest-BMBF 98
- Erfolgskontrollbericht
- Berichtsblatt

I. 1. Aufgabenstellung

Das Aktin-bindende Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein VASP verschränkt Signalwege mit der zytoskelettalen Dynamik. Beim humanen VASP sind drei Phosphorylierungsstellen bekannt: S157, S239 und T278. S157 und S239 werden vor Allem von der cAMP-abhängigen Proteinkinase PKA bzw. der cGMP-abhängigen Proteinkinase PKG phosphoryliert, T278 hingegen erwies sich (*in vitro*) als Substrat der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK). Differentielle Phosphorylierung dient erwiesenermaßen der VASP-Regulierung hinsichtlich des Aktinhaushalts; die dem zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen sowie die involvierten Protein-Protein Interaktionen sind jedoch nach wie vor unbekannt. In der vorliegenden Studie unternahmen wir deshalb den Versuch eines differentiellen proteomischen Ansatzes mit Zielsetzung, die Einzelkomponenten des Phospho-Interaktoms von VASP in HEK293-Zellen, in Thrombozyten, sowie in humanen Endothelzellen zu identifizieren.

I. 2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

In Vorarbeit wurden phospho-mimetische VASP-Mutanten generiert, in denen die endogenen Phosphorylierungsstellen entweder durch saure Aminosäuren oder durch Alanine substituiert wurden, um so entweder einen konstitutiv phosphorylierten bzw. nicht-phosphorylierten Zustand zu simulieren (T. Renné et al., Karolinska University Hospital Stockholm). Diese Konstrukte - VASP-S157D, S239D, T278E (DDE) und VASP-AAA - sollten rekombinant zur Expression gebracht und im Anschluss für eine differentielle proteomische Interaktionsstudie herangezogen werden.

I. 3. Planung und Ablauf des Vorhabens, vorläufige Ergebnisse

Die in I. 2. beschriebenen VASP-Konstrukte wurden zunächst rekombinant in BL21 E. coli exprimiert, über Affinitätschromatographie aufgereinigt und schließlich kovalent an eine Affinitätsmatrix bzw. Affinitätssäule gekoppelt. Im Anschluss wurden konfluente humane EA.hy926 Endothelzellen lysiert und die resultierende zytosolische Proteinfraction mit den VASP-DDE- bzw. VASP-AAA-Säulen inkubiert. Eine Eluierung der spezifisch an die Säulen gebundenen Proteine erfolgte dann über einen pH-Gradienten.

Die eluierten Fraktionen wurden mittels 2D-PAGE und MALDI-TOF analysiert, was zur Identifizierung von mehr als 100 putativen VASP-Interaktionspartnern führte. Der überwiegende Teil dieser Proteine band an VASP unabhängig von dessen pseudo-Phosphorylierungszustand. Elf Proteine interagierten jedoch spezifisch mit VASP-AAA und nicht mit VASP-DDE (und umgekehrt). α II-Spectrin, welches spezifisch VASP-AAA, jedoch nicht die pseudo-phosphorylierte Form bindet, wurde im Folgenden näher analysiert.

Western Blotting, Co-Immunopräzipitation, Pulldown-Experimente und Immunfluoreszenz bestätigten eine direkte Interaktion zwischen nicht-phosphoryliertem VASP und α II-Spectrin (SPCN) in endothelialen und epithelialen Zelllinien im Bereich der interendothelialen Kontakte (interendothelial junction, IEJs). GST-pull-down Assays und Peptidscans zeigten hierbei die Bindung der SPCN-SH3 Domäne an das GP₅ Motiv von VASP auf und demonstrierten, dass die Assemblierung des SPCN/ VASP Komplexes durch PKA-vermittelte VASP-S157-Phosphorylierung *in vitro* und *in vivo* unterbunden wird. Der Umfang der S157-Phosphorylierung verhält sich dabei indirekt proportional zum Grad der Ausbildung von IEJs; sie verhindert somit die Ausbildung des SPCN/ VASP Komplexes in vereinzelt wachsenden Zellen. Ektopische Expression der mit dem Tight Junction Protein Claudin-5 fusionierten

SPCN-SH3 Domäne initiierte darüber hinaus die Translokation von VASP an die Plasmamembran und förderte hier die Ausbildung kortikalen Aktinzytoskeletts. [1, 2]

Die Identifizierung von α II-Spectrin als neuen VASP-Interaktionspartner zeigt prinzipiell die Funktionalität unserer auf einem differentiellen proteomischen Ansatz beruhenden Strategie auf. Die Expression der von uns untersuchten VASP-Konstrukte in BL21 E.coli hatte allerdings zwei entscheidende Nachteile: erstens war sie nur schwer durchführbar und ließ sich daher nicht ohne Weiteres wiederholen; zweitens mussten die Ergebnisse stets vor einem prokaryotischen Hintergrund betrachtet werden. Die wichtige Frage, ob die resultierenden VASP-Konstrukte also eine korrekte Faltung und damit auch biologische Relevanz aufwiesen, blieb somit beispielsweise offen und kann nur durch das Arbeiten mit eukaryotischen Expressionssystemen beantwortet werden. Zweitens zeigten unsere sich anschließenden Arbeiten vor eukaryotischem Hintergrund (siehe Erfolgskontrollbericht 4.) deutlich, dass sich die starke Bindung von Ena/VASP an F-Aktin generell als problematisch für eine *in vivo* Interaktions-Analyse erwies. Solange diese Bindung besteht bzw. nicht abgeschwächt werden kann, ist demzufolge, unabhängig von der gewählten *in vivo* Methode, im Zuge der Isolierung von VASP und/ oder VASP-Konstrukten stets mit Anwesenheit unspezifischer Interaktionspartner (falsch positive Identifikationen in Folge unspezifischer Anreicherung), sowie mit der hochgradigen Verunreinigung der Proben durch zytoskelettales (F-) Aktin zu rechnen.

Zur Lösung des Problems modifizierten wir die ursprüngliche Idee einer *in vivo* Analyse des phosphospezifischen VASP-Interaktoms auf Basis der phosphomimetischen Konstrukte VASP-AAA (S157A, S239A, T278A) und VASP-DDE (S157D, S239D, T278E). Diese sollten jetzt in einem heterologen eukaryotischen zellulären System (in unserem Fall HEK293-Zellen) exprimiert und anschließend z. B. mittels *in vivo*-IP (resp. Co-IP) isoliert und analysiert werden. Im Vorfeld mussten die bislang vorliegenden VASP-Konstrukte hierfür wie folgt abgewandelt werden:

- a) Der Umstand, dass alle früheren VASP-Konstrukte über ihre VASP-Tetramerisierungsdomäne (VASP-EVH2C, auch VASP-TD) durchaus in der Lage sind, in eukaryoten Zellsystemen auch Heterotetramere mit endogenem Ena/VASP auszubilden, kann zur Verfälschung der Ergebnisse führen. Zur Umgehung des Problems wurde daher die VASP-TD von VASP-AAA bzw. -DDE deletiert. Da die VASP-Funktion an F-Aktin die Ausbildung von VASP-Tetrameren erfordert, könnte dieser Schritt zudem bereits zu einer Abschwächung der Bindung der VASP-Konstrukte an F-Aktin führen.
- b) Eine vollständige Inaktivierung der VASP-Bindung an F-Aktin kann über die Deletion der F-Aktin-Bindungsdomäne von VASP (VASP-FAB) erreicht werden. Diese wurde daher ebenfalls an zuvor TD-deletierten VASP-AAA bzw. -DDE Konstrukten durchgeführt.
- c) Die vier resultierenden VASP-Konstrukte (VASP-AAA Δ TD und -AAA Δ TD Δ FAB, bzw. VASP-DDE Δ TD und -DDE Δ TD Δ FAB) mussten in einen Transfektionsvektor umklontiert werden, der in einem eukaryotischen System exprimiert werden kann und im Anschluss eine Aufreinigung mittels IP (resp. Co-IP) oder Affinitätschromatographie zulässt. Hierfür wurde der Vektor pcDNA3.1/ V5-His A (Invitrogen) gewählt. Die Expression erfolgt in

¹ P.M. Benz et al, Cytoskeleton assembly at endothelial cell-cell contacts is regulated by α II-Spectrin-VASP complexes; J. Cell. Biol. 180: 205-219. 2008

² P.M. Benz et al, Prostaglandin-induced VASP phosphorylation controls α II-Spectrin breakdown in apoptotic cells; Int. Immunopharmacol. 8(2): 319-24. 2008

diesem unter Regulation des CMV-Promoters; eine Aufreinigung der resultierenden transgenen Proteine ist über den C-terminalen His6-Tag mittels Ni-Affinitätschromatographie (bzw. IMAC) möglich. Eine ID der exprimierten Proteine kann zudem z.B. durch Westernblot gegen den His6-Tag bzw. gegen das ebenfalls C-terminal gelegene V5-Epitop erfolgen.

Parallel zur *in vivo*-Studie wird zudem eine *in vitro*-Interaktionsanalyse der VASP-Phosphosites (S157, S239, T278) durchgeführt. Diese erforderte die Generierung und Aufreinigung von jeweils eine dieser Phosphosites enthaltenden Peptiden (sowohl in phosphoryliertem, als auch in nicht-phosphoryliertem Zustand), ihre Kopplung an Affinitätsmatrices und anschließend die Inkubation mit geeigneten nativen zellulären Lysaten (HEK293-Zellen, Endothelzellen, Thrombozyten) für eine differentielle, MS-gekoppelte Interaktionsstudie (wie unter I. 3. beschrieben). Zudem sollen besagte Peptide später als Basis zur Generierung polyklonaler und monoklonaler Antikörper gegen die entsprechenden VASP-Phosphorylierungsstellen dienen.

I. 4. Verwendete Fachliteratur

- 1) Benz, P. M. et al. (2008). Cytoskeleton assembly at endothelial cell-cell contacts is regulated by α II-Spectrin-VASP complexes. *J. Cell. Biol.* 180: 205-219.
- 2) Benz, P. M. et al. (2008). Prostaglandin-induced VASP phosphorylation controls α II-Spectrin breakdown in apoptotic cells; *Int. Immunopharmacol.* 8(2): 319-24.
- 3) Bachmann, C., Fischer, L., Walter, U., and Reinhard, M. (1999). The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. *J Biol Chem* 274, 23549-23557.
- 4) Ball, L. J., Kuhne, R., Hoffmann, B., Hafner, A., Schmieder, P., Volkmer-Engert, R., Hof, M., Wahl, M., Schneider-Mergener, J., Walter, U., et al. (2000). Dual epitope recognition by the VASP EVH1 domain modulates polyproline ligand specificity and binding affinity. *Embo J* 19, 4903-4914.
- 5) Barzik, M., Kotova, T. I., Higgs, H. N., Hazelwood, L., Hanein, D., Gertler, F. B., and Schafer, D. A. (2005). Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. *J Biol Chem* 280, 28653-28662.
- 6) Bear, J. E., Loureiro, J. J., Libova, I., Fassler, R., Wehland, J., and Gertler, F. B. (2000). Negative regulation of fibroblast motility by Ena/VASP proteins. *Cell* 101, 717-728.
- 7) Bournier, O., Kroviarski, Y., Rotter, B., Nicolas, G., Lecomte, M. C., and Dhermy, D. (2006). Spectrin interacts with EVL (Enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein-like protein), a protein involved in actin polymerization. *Biol Cell* 98, 279-293.
- 8) Brindle, N. P., Holt, M. R., Davies, J. E., Price, C. J., and Critchley, D. R. (1996). The focal-adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) binds to the proline-rich domain in vinculin. *Biochem J* 318 (Pt 3), 753-757.

- 9) Butt, E., Abel, K., Krieger, M., Palm, D., Hoppe, V., Hoppe, J., and Walter, U. (1994). cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J Biol Chem* 269, 14509-14517.
- 10) De Matteis, M. A., and Morrow, J. S. (2000). Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway. *J Cell Sci* 113 (Pt 13), 2331-2343.
- 11) Haffner, C., Jarchau, T., Reinhard, M., Hoppe, J., Lohmann, S. M., and Walter, U. (1995). Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-rich focal adhesion and microfilament-associated protein VASP. *Embo J* 14, 19-27.
- 12) Harbeck, B., Huttelmaier, S., Schluter, K., Jockusch, B. M., and Illenberger, S. (2000). Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin. *J Biol Chem* 275, 30817-30825.
- 13) Howe, A. K., Hogan, B. P., and Juliano, R. L. (2002). Regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation and interaction with Abl by protein kinase A and cell adhesion. *J Biol Chem* 277, 38121-38126.
- 14) Krause, M., Dent, E. W., Bear, J. E., Loureiro, J. J., and Gertler, F. B. (2003). Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 541-564.
- 15) Kuhnel, K., Jarchau, T., Wolf, E., Schlichting, I., Walter, U., Wittinghofer, A., and Strelkov, S. V. (2004). The VASP tetramerization domain is a right-handed coiled coil based on a 15-residue repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17027-17032.
- 16) Kwiatkowski, A. V., Gertler, F. B., and Loureiro, J. J. (2003). Function and regulation of Ena/VASP proteins. *Trends Cell Biol* 13, 386-392.
- 17) Lambrechts, A., Kwiatkowski, A. V., Lanier, L. M., Bear, J. E., Vandekerckhove, J., Ampe, C., and Gertler, F. B. (2000). cAMP-dependent protein kinase phosphorylation of EVL, a Mena/VASP relative, regulates its interaction with actin and SH3 domains. *J Biol Chem* 275, 36143-36151.
- 18) Profirovic, J., Gorovoy, M., Niu, J., Pavlovic, S., and Voyno-Yasenetskaya, T. (2005). A novel mechanism of G protein-dependent phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein. *J Biol Chem* 280, 32866-32876.
- 19) Reinhard, M., Giehl, K., Abel, K., Haffner, C., Jarchau, T., Hoppe, V., Jockusch, B. M., and Walter, U. (1995). The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *Embo J* 14, 1583-1589.
- 20) Scott, J. A., Shewan, A. M., den Elzen, N. R., Loureiro, J. J., Gertler, F. B., and Yap, A. S. (2006). Ena/VASP proteins can regulate distinct modes of actin organization at cadherin-adhesive contacts. *Mol Biol Cell* 17, 1085-1095.
- 21) Sechi, A. S., and Wehland, J. (2004). ENA/VASP proteins: multifunctional regulators of actin cytoskeleton dynamics. *Front Biosci* 9, 1294-1310.

22) Zhang, Y., Tu, Y., Gkretsi, V., and Wu, C. (2006). Migfilin interacts with vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) and regulates VASP localization to cell-matrix adhesions and migration. *J Biol Chem* 281, 12397-12407.

23) Francois Ferron, Grzegorz Rebowski, Sung Haeng Lee and Roberto Dominguez (2007). Structural basis for the recruitment of profilin-actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. *Embo J* 26, 4597-4606.

I. 5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Alle VASP-Konstrukte wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ulrich Walter, Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie der Universität Würzburg, und Prof. Dr. Thomas Renné, Karolinska University Hospital Stockholm, generiert.

II. 1. Aktuell erzielte Ergebnisse und Ausblick

Alle vier VASP-Konstrukte (VASP-AAA Δ TD und -AAA Δ TD Δ FAB, bzw. VASP-DDE Δ TD und -DDE Δ TD Δ FAB) konnten mittlerweile erfolgreich mittels PCR generiert werden (Kontrolle über DNA-Sequenzierung) und liegen in pcDNA3.1/ V5-His A vor. Zwei von diesen, VASP-AAA Δ TD und -AAA Δ TD Δ FAB, zeigten nach Transfektion mittels ExGen500 (Fermentas) Expression in HEK293-Zellen. Der Nachweis hierfür erfolgte über anti-VASP-Westernblots entsprechender Zellysate. Erste Versuche zur Aufreinigung und Anreicherung der Konstrukte inklusive ihrer putativen Interaktionspartner aus HEK293-Zellen laufen mittels Ni-Affinitätschromatographie und gestalten sich vielversprechend. Bei Erfolg wird mit VASP-DDE Δ TD und -DDE Δ TD Δ FAB analog verfahren werden.

II. 2. Notwendigkeit und Angemessenheit der Arbeit, sowie Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplanes

Die durchgeführten Versuche dienen der Grundlagenforschung am Protein VASP und seiner Schlüsselfunktion im Rahmen der Remodellierung des Cytoskeletts, sowie allgemein der Entwicklung von Methoden zur differenziellen phospho-spezifischen Proteomanalyse vor hohem Aktin-Hintergrund. Hinsichtlich der Rolle von VASP in endothelialeem Gewebe, in Thrombozyten, sowie bei der Metastasierung von Tumoren ist dies nicht zuletzt auch von klinischer Relevanz.

II. 3. Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Nicht bekannt.

II. 4. Darstellung der erfolgten oder geplanten Veröffentlichung der Ergebnisse

Es wurden bislang zu diesem Projekt von unserer Seite noch keine Veröffentlichungen eingereicht. Dies ist allerdings bis zum 31.12.2010 durch Fortführung des Projektes unter Kostenübernahme seitens des Leibniz - Institut für Analytische Wissenschaften - ISAS - e.V., Dortmund, geplant.